

SUBSTRATE FOR CULTURE OF VASCULAR ENDOTHELIAL CELL AND ITS PRODUCTION

Publication number: JP7135961
Publication date: 1995-05-30
Inventor: ONOHARA MASAYUKI; TANAKA HAYAO
Applicant: SUMITOMO BAKELITE CO
Classification:
- **international:** **C12M3/00; C12N5/02; C12M3/00; C12N5/02; (IPC1-7):**
C12M3/00; C12N5/02
- **European:**
Application number: JP19930290599 19931119
Priority number(s): JP19930290599 19931119

Report a data error here

Abstract of JP7135961

PURPOSE: To provide a substrate for the culture of vascular endothelial cell, containing a cell-adhesive protein having a specific concentration in a mixture with a phospholipid and capable of forming a tubular structure with vascular endothelial cells in a relatively short time simply by disseminating and culturing the vascular endothelial cells. **CONSTITUTION:** The concentration of a cell-adhesive protein (e.g. Type-I collagen) in a mixture with a phospholipid is adjusted to 0.01-5%, preferably 0.05-3%. The mixture is diluted e.g. by dissolving in a mixed water-alcohol solvent, applied to a cell culture vessel and dried to obtain the objective substrate for the culture of vascular endothelial cell.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-135961

(43) 公開日 平成7年(1995)5月30日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 3/00	Z			
C 1 2 N 5/02		8412-4B		

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平5-290599

(22) 出願日 平成5年(1993)11月19日

(71) 出願人 000002141

住友ベークライト株式会社
東京都品川区東品川2丁目5番8号

(72) 発明者 斧原 正幸

東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住
友ベークライト株式会社内

(72) 発明者 田中 速雄

東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 住
友ベークライト株式会社内

(54) 【発明の名称】 血管内皮細胞培養用基材及びその製造方法

(57) 【要約】

【構成】 細胞接着性タンパク質とリン脂質との混合組成物であって、細胞接着性タンパク質の濃度が組成物全体の0.01乃至5%である組成物を細胞培養基材とし、この基材を水-アルコール系の溶媒を用いて、培養容器の表面に塗布して、血管内皮細胞用の培養器具を得る

【効果】 従来の細胞培養ディッシュでは、血管内皮細胞は接着して単層に培養することしかできなかったが、本発明の培養用基材を用いると、簡単にかつ再現性よく、血管内皮細胞の管状構造が形成でき、生体内に近い血管内皮細胞の形態をin vitroで再現することが可能になり、血管新生のメカニズムの研究や、血管修復用医薬品の薬効評価など、幅広い研究に利用可能である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞接着性タンパク質とリン脂質との混合組成物であって、細胞接着性タンパク質の濃度が組成物全体の0.01乃至5%であることを特徴とする、血管内皮細胞の管状構造が形成可能な血管内皮細胞培養用基材。

【請求項2】 細胞接着性タンパク質が、タイプIコラーゲン、タイプIVコラーゲン、ゼラチン、ファイブロネクチン、ラミニンからなる群から選ばれた少なくとも1種のタンパク質からなることを特徴とする、請求項1記載の血管内皮細胞培養用基材。

【請求項3】 リン脂質が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジエタノールアミン、ホスファチジイルノシトール、スフィンゴミエリン、レシチン、及びこれらの不飽和脂肪酸の水素添加物、あるいはこれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも1種のリン脂質からなることを特徴とする、請求項1記載の血管内皮細胞培養用基材。

【請求項4】 細胞接着性タンパク質とリン脂質とを、これらの組成物中に占める細胞接着性タンパク質の濃度が0.01乃至5%になるように、水-アルコール系混合溶媒に溶解して溶液を調製し、ディッシュ、プレート、フラスコ等の細胞培養器に塗布後乾燥することを特徴とする、血管内皮細胞培養用基材の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、血管内皮細胞培養用基材に関するもので、特に、血管内皮細胞に管状構造を形成させるための培養用基材、及びその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血管内皮細胞は、市販のプラズマ処理培養器にて単層で敷石状に接着させて培養するのが一般的である。また、細胞の接着性を向上させるために、コラーゲンを塗布した培養器も市販され広く使用されている。

【0003】しかし比較的最近では、コラーゲンゲル上で培養すると、血管内皮細胞がゲル内にもぐり込み管腔を形成するという報告もある。また、コンフルエントに達した単層内皮細胞を、増殖因子を含まない培養液に換えてその中で培養し続けると、フラスコ面から細胞がところどころ剥がれて網目状の集合塊を作り、その際、網目の各々の系に当たる部分は管状の断面を有するようになる、という報告もなされるようになった。(いずれも、室田誠逸編、「血管細胞の培養法とその応用」、東京化学同人、1990年刊による)

【0004】このように、最近は血管内皮細胞が生体外でも毛細血管のような管腔構造をとるという特異な性質があることが分かってきた。また、血管内皮細胞は、血管新生、障害血管の治癒過程、動脈硬化の成因などの解

2

明を目的に広く研究が進められている。そのような動向の中で、*in vitro* (試験管内) で血管内皮細胞に管腔構造を形成させることによって、より生体に近い研究を*in vitro*で行なうことが可能になってきた。

【0005】しかし、現在、そのような管腔構造を形成する機構が明確ではなく、管腔構造を形成させるのに長期間の培養が必要であったり、再現性に乏しかったりする問題があり、それが血管内皮細胞の研究進捗の一つの障害ともなっている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、血管内皮細胞の培養用基材で、特に、血管内皮細胞を播種し公知の培養条件にて培養するだけで、比較的短期に血管内皮細胞が管腔構造を形成するような基材を提供し、血管内皮細胞の生物学的、医学的研究を促進できるような培養用基材を提供することを目的としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】即ち本発明は、細胞接着性タンパク質とリン脂質との混合組成物であって、細胞接着性タンパク質の濃度が組成物全体の0.01乃至5%であることを特徴とする、血管内皮細胞の管状構造が形成可能な血管内皮細胞培養用基材であり、また更に、細胞接着性タンパク質とリン脂質とを、これらの組成物中に占める細胞接着性タンパク質の濃度が0.01乃至5%になるように水-アルコール系混合溶媒に溶解して溶液を調製し、ディッシュ、プレート、フラスコ等の細胞培養器に塗布後乾燥することを特徴とする、血管内皮細胞培養用基材の製造方法である。

【0008】本発明者らは、先に、基材表面にリン脂質を疎水結合させることにより超親水性の表面が得られ、その表面には細胞がほとんど接着しないことを見出し、特開平5-161491号公報等に開示した。一方、コラーゲン等の細胞接着性タンパク質は、種々の足場依存性細胞を接着増殖させるものとして広く培養に使用されており、また、コラーゲンを塗布した培養器が既に市販されている。

【0009】本発明者らは、これらの細胞接着性タンパク質と、細胞がほとんど接着しないリン脂質との混合組成物上では、血管内皮細胞が管腔構造を形成する傾向があることを見出し、鋭意研究を進めて本発明を完成させるに至った。

【0010】本発明において使用する細胞接着性タンパク質とは、タイプIコラーゲン、タイプIVコラーゲン、ゼラチン、ファイブロネクチン、ラミニンからなる群から選ばれた少なくとも1種のタンパク質である。特に、コスト的にはコラーゲン、ゼラチンが最も適している。しかし、血管内皮細胞がヒト由来の場合は、培養条件にもよるが、ファイブロネクチン、ラミニンがより効果的である。

【0011】また、本発明において使用するリン脂質

3

は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、レシチン及びこれらの不飽和脂肪酸の水素添加物、あるいはこれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも1種のリン脂質からなっている。

【0012】本発明による血管内皮細胞培養用基材中における、細胞接着性タンパク質とリン脂質との混合割合は極めて重要であり、細胞接着性タンパク質の濃度は0.01乃至5%好ましくは、0.05乃至3%が適している。細胞接着性タンパク質の濃度が0.01%未満では、血管内皮細胞はほとんど接着せず細胞凝集塊を形成する傾向があり、一方、細胞接着性タンパク質の濃度が5%を越えると、血管内皮細胞は接着して増殖するようになり、いずれの場合も、血管内皮細胞は管腔構造を形成しにくくなる。

【0013】本発明の製造方法において使用する細胞接着性タンパク質とリン脂質との溶媒としては水-アルコール系溶媒が適している。アルコールは特に限定はないが、メタノール、エタノールのような汎用の1価の脂肪族アルコールが使用できる。また、水とアルコールとの混合比率は、使用する細胞接着性タンパク質及びリン脂質によって異なる。

【0014】細胞接着性タンパク質とリン脂質の溶液を調整するには、まず、細胞接着性タンパク質を水に溶解させたものを調製しておくが、この時、例えばコラーゲンでは、酢酸等の酸性下で十分に溶解させておくなど一般の公知の方法が使用できる。次に、リン脂質の所定量をアルコールに溶解させておき、これに攪拌下に細胞接着性タンパク質の水溶液を徐々に添加して、均一な溶液を調製することができる。最終的に調製する溶液中の総溶質濃度については、特に限定するものではないが、塗布後の外観あるいは経済性を考慮して、総溶質濃度は0.5乃至5%とするのが適している。0.5%未満では塗布の効果が十分ではなく、逆に5%を越えると、塗布表面が荒れたり、表面が不均一になったり経済的にも不利になる。こうして調製した溶液は、市販のポリスチレン製のディッシュ、プレートなどの培養器に塗布した後、室温にて風乾することによって容易に細胞培養用の基材とすることが可能である。

【0015】また、本発明における細胞接着性タンパク質の内、コラーゲン以外の細胞接着性タンパク質は、塗布後に、紫外線を照射して若干の架橋を施しておくことが望ましい。コラーゲンは中性領域では水に不溶であるが、他のタンパク質は中性領域では水に溶解し易いものが多いため、このような架橋処理を施しておかないと培養中に培地に溶出し、塗布効果が低下する場合がある。もちろん、架橋処理の方法にはグルタルアルデヒドなどの化学処理法もあるが、細胞に毒性を与える懸念があるため好ましくはない。また、紫外線処理は、通常のク

4

リーベンチ内の紫外線装置を使用することができ、照射時間は5分から2時間程度で十分である。あまり長時間の照射を行うと、コラーゲンのみならずリン脂質の分解などが生じ、塗布の効果が低下する傾向にあり、好ましくはない。

【0016】このようにして得られた、培養用基材に血管内皮細胞を播種すると、短期間に、かつ再現性良く、細胞は管腔構造を形成する。何故、本発明の培養用基材上で、血管内皮細胞が管腔構造を形成するかについては、詳細な研究をしなければ明確なことはわからないが、以下のように推定している。即ち、細胞接着性タンパク質上では血管内皮細胞は良好に接着して増殖し、経時的にコンフルエントになることはよく知られている。また、本発明者らのこれまでの検討では、リン脂質を塗布した基材上では、おそらくリン脂質のコリンリン酸部分が超親水性であるためにタンパク質や細胞の接着・吸着が抑制され、血管内皮細胞も接着しないものと推測される。

【0017】ところが、この両者ある比率で複合した基材上で血管内皮細胞を培養すると、基本的には細胞が接着する足場が必要最低限に存在しながら、足場としての基材の影響が極めて少ないために、血管内皮細胞同士の細胞間相互作用を助長する結果となり、血管内皮細胞は本来の形態形成を促進され、結果として毛細血管に類似した管腔構造をとるのではないかと推定される。もちろん、管腔構造の形成には、培地や血清中の液性因子の影響もあるものと考えられるが、基材に限定して考えた場合、血管内皮細胞は明らかに本発明の基材の表面構造を認識し、能動的な形態形成に向かう行動をとるものと推定できる。

【0018】

【実施例】以下、実施例によって本発明の効果を説明する。

〔実施例1及び比較例1, 2〕日本精化(株)製ジバルミトイルホスファチジルコリン(以下DPPCと略記する)0.1gを、エタノールに溶解し全量を10mlとした。次いで、和光純薬工業(株)製タイプIコラーゲン(3mg/ml、塩酸酸性溶液)0.1mlを、上記DPPCのエタノール溶液に、攪拌下に徐々に添加し均一な溶液を調製した。得られた溶液の、総溶質濃度は約1g/100mlで、DPPCとコラーゲンの総量に対するコラーゲンの濃度は約0.03wt%であった。

【0019】この溶液1mlを直径35mmのディッシュ(住友ベークライト(株)製スミロンMS-1035R)に塗布し、溶液を吸引除去した後、クリーンベンチ内で3時間風乾した。一方、比較例として、上記のDPPCのエタノール溶液のみを塗布したディッシュ(比較例1)、及び市販の細胞培養ディッシュ(住友ベークライト(株)製スミロンSM-1035O)(比較例2)を用意した。

5

6

【0020】次いで、基礎培地ダルベッコ改変MEMに10%FCS（ウシ胎児血清）を添加した培地にて、ブタの大動脈から採取した血管内皮細胞を 1×10^4 /mlの濃度で調製した。この血管内皮細胞を上記の3種類のディッシュに播種し、3時間後に顕微鏡にて観察すると共に培地交換し、更に4日間培養し7日目に顕微鏡にて再び細胞の形態を観察した。

【0021】その結果は表1に示した通りで本発明の細*

表1 血管内皮細胞の培養形態(1)

培養用基材		血管内皮細胞の形態	
		3日後	7日後
実施例1	DPPC+ コラーゲン	接着しているが、伸展が 少ない。	細胞が線状につながり、 毛細血管類似構造を形成。
比較例1	DPPC	全く接着せず、細胞は丸 い形態で浮遊している。	細胞は3次元の凝集体を 形成して、浮遊状態。
比較例2	市販の ディッシュ	部分的に接着し、やや増 殖。細胞の伸展は大きい。	敷石状にはマコンフルエ ウトに単層の培養形態。

(註) DPPC: ジ パルミトイル ホスファチジル コリン

【0023】〔実施例2及び比較例3〕日本精化(株) 製ジミリストイルホスファチジルコリン（以下DMPCと略記する）0.1gを、メタノールに溶解し全量を10mlとした。また、和光純薬工業(株) 製ゼラチン（ウシ骨製）を純水に溶解し、3mg/mlの溶液を調製し、この0.1mlを上記DMPCのメタノール溶液に、攪拌下に徐々に添加し、均一な溶液を調製した。

【0024】この溶液1mlを直径35mmのディッシュ（住友ベークライト(株) 製スミロンMS-1035R）に塗布し、溶液を吸引除去した後、クリーンベンチ内で3時間風乾し、更にクリーンベンチ内で紫外線を10分間照射した。一方、比較例として、上記のDMPCのメタノール溶液のみを塗布したディッシュ（比較例3）を用意した。

※

表2 血管内皮細胞の培養形態(2)

培養用基材		7日後の血管内皮細胞の形態
実施例2	ゼラチン+ DMPC	内皮細胞は不規則な線状構造をとり、互いに絡みつくように細長い紐状構造を呈した。 また、実施例1よりもその紐状構造の長さはかなり長く、最高7mmにも達するものが観察できた。
比較例3	DMPC	一部に接着増殖しコロニーを形成している細胞も見られたが、一部に細胞同士が凝集塊を形成し、大半は独立した浮遊状態で存在し、トリパンブルーで染まることから死滅していると推測される。

(註) DMPC: ジ ミリストイル ホスファチジル コリン

【0027】

【発明の効果】以上のように、本発明の細胞接着性タンパク質とリン脂質との混合組成物を塗布した培養用基材を用いると、簡単に血管内皮細胞の管腔構造が形成できるために、血管新生のメカニズム、血管修復用医薬品の

* 胞培養基材上では、血管内皮細胞は毛細血管様の線状構造を形成することが分かった。また、本実施例の7日目の線状構造体を、手術用のメスで注意深く幅方向に切開したところ、その断面が露出し、明らかに内径 $20 \mu\text{m}$ の程度の管腔構造を有していることが分かった。

【0022】

【表1】

20※【0025】次いで、ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞（三光純薬(株) 製ENDOCELL-UV）を 1×10^4 /mlの濃度に調製した。培地は、15%FCS、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ECGF（COLLABORATIVE RESRARCH社製、内皮細胞増殖因子）、及び $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリン（小玉(株) 製）を含有するRPMI-1640培地を調製し使用した。この血管内皮細胞を、上記の2種類のディッシュに播種し、4日間はそのまま培養し、後は2日毎に培地交換し、10日目に顕微鏡にて細胞の形態を観察した。その結果は表2に示した通りであった。

【0026】

【表2】

薬効評価、動脈硬化の成因とその治療薬の評価、動物実験代替システムなど、より生体に近い状態での研究が可能になり、この分野の研究開発に少なからず貢献するものと期待される。